

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09211010
PUBLICATION DATE : 15-08-97

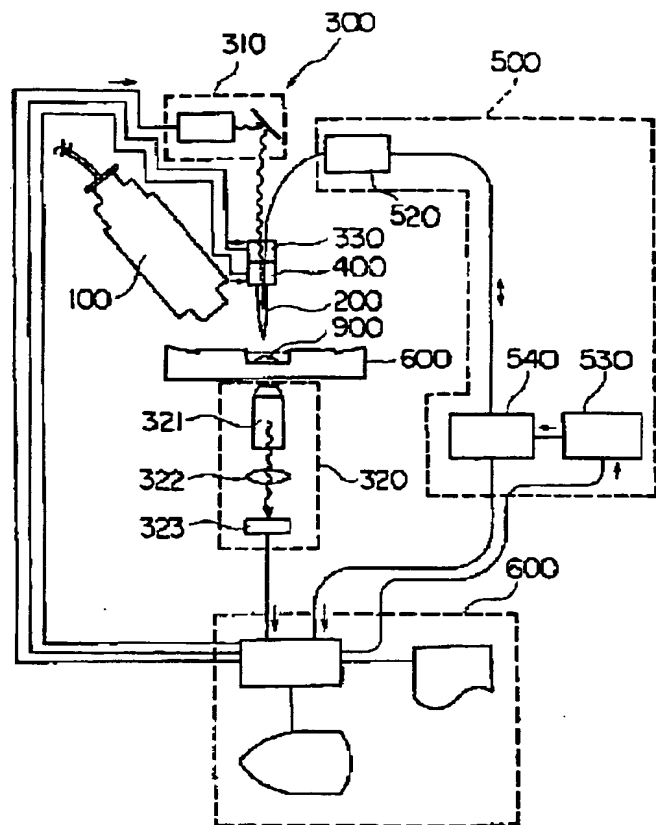
APPLICATION DATE : 06-02-96
APPLICATION NUMBER : 08020125

APPLICANT : BUNSHI BIO PHOTONICS
KENKYUSHO:KK;

INVENTOR : WATANABE AKIHIKO;

INT.CL. : G01N 37/00 G01N 27/416 G01N 33/48
G01N 33/483

TITLE : ELECTROPHYSIOLOGICAL
CHARACTERISTIC MEASURING
DEVICE



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To enable microscopic observation or the measurement of electrophysiological characteristics with high position resolving power by integrally analyzing local image data obtained by a scanning type proximity field optical microscope part and electrophysiological characteristic data obtained by a patch clamp measuring part.

SOLUTION: An optical microscope part 100 observes the wide area image of a sample 900. Then, the local image of the sample 900 is observed by a scanning type proximity field optical microscope part 300 while the sample is scanned by a glass micropipette electrode outputting evanescent light from the fine aperture of the leading end thereof. An electrode height setting part 400 sets the leading end of a glass micropipette electrode 200 to the distance within 200nm from the surface of the sample 900 and a current is led out through the glass micropipette electrode 200 by a patch clamp measuring part 500 to be recorded. These physiological data are collected and analyzed to be recorded and the whole of the apparatus is controlled by an analysis control part 600.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-211010

(43) 公開日 平成9年(1997)8月15日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 37/00			G 0 1 N 37/00	D
27/416			33/48	M
33/48			33/483	F
33/483			27/46	U

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平8-20125

(22) 出願日 平成8年(1996)2月6日

(71) 出願人 595047385

株式会社分子バイオホトニクス研究所
静岡県浜北市平口5000番地

(72) 発明者 奥山 佳正

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内

(72) 発明者 渡辺 明彦

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内

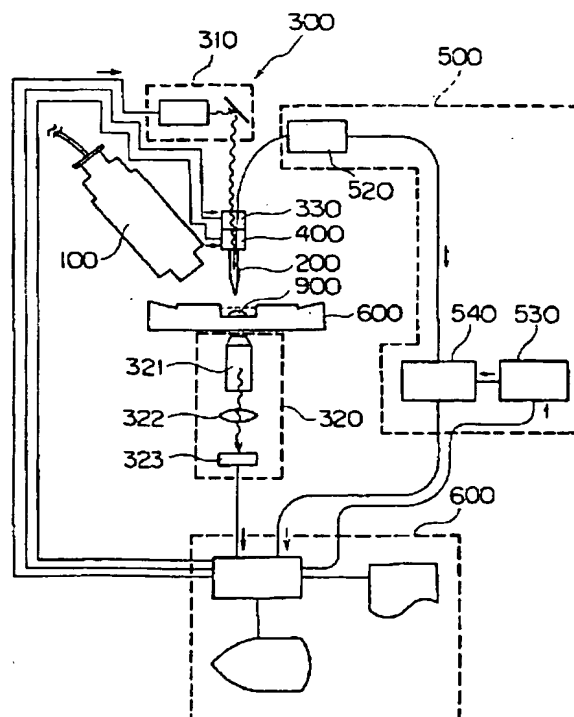
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 電気生理特性測定装置

(57) 【要約】

【目的】 簡易な構成で、高い位置分解能で顕微観察や電気生理学特性測定が可能な電気生理特性測定装置を提供する。

【構成】 試料900の広域像を観察する光学顕微鏡部100と、先端に微小開口を有し、先端の微小開口からエバネッセント光を出力するガラスマイクロピペット電極200と、ガラスマイクロピペット電極200を走査しながら、試料900の局所像を観察する走査型近接場光学顕微鏡部300と、ガラスマイクロピペット電極200の先端を試料900の表面から200nm以内の距離に設定する電極高さ設定部400と、電流をガラスマイクロピペット電極200を介して導出して記録するパッチクランプ測定部500と、電気生理学的情報を収集し、解析し、記録するとともに装置全体を制御する解析制御部600とを備える。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料の広域像を観察する光学顕微鏡部と、
先端に微小開口を有し、外周部に光反射膜および絶縁膜が形成されるとともに、内部空間に電極液を収納し、後端の開口から前記微小開口の径より長い波長の光が導入されると、前記微小開口からエバネッセント光を出力するガラスマイクロピペット電極と、
照射光を発生する光照射部を備え、前記ガラスマイクロピペット電極を移動しながら、前記ガラスマイクロピペット電極を介してエバネッセント光を試料に照射し、前記試料の局所像を観察する走査型近接場光学顕微鏡部と、
前記ガラスマイクロピペット電極と前記試料との間の距離を200nm以下に近接させる電極高さ設定手段と、
前記ガラスマイクロピペット電極を通して電圧を印加して、その結果生じた電流を検出するとともに、前記試料中の単一の生細胞あるいは生体膜の微小な領域から生体膜を横切る電流を前記電極液を介して導出して記録するパッチクランプ測定部と、
前記走査型近接場光学顕微鏡部から得られた前記試料の局所像と、前記走査型近接場光学顕微鏡部の光の照射位置ごとに前記パッチクランプ測定部から得られた電気生理学的情報とを収集し、記録し、解析するとともに、装置全体を制御する解析制御部と、
を備えることを特徴とする電気生理特性測定装置。

【請求項2】 前記パッチクランプ測定部は、
前記ガラスマイクロピペット電極で検出された生体電気信号である前記生体膜を横切る電流信号を入力し、電圧信号に変換し、増幅して出力する前置増幅器と、
前記解析制御部からの指示により、シール抵抗の測定、膜電位固定、または膜電流固定に関する指令信号を出力する電気信号発生装置と、
前記前置増幅器から出力された電圧信号を入力し、増幅し、処理して前記解析制御部へ向けて出力するとともに、前記電気信号発生装置から出力された前記指令信号を入力し、演算処理して前記前置増幅器へ向けて出力する主増幅器と、
を備えることを特徴とする請求項1記載の電気生理特性測定装置。

【請求項3】 前記電極高さ設定手段は共振位相検知法を用いる、ことを特徴とする請求項1記載の電気生理特性測定装置。

【請求項4】 前記光学顕微鏡部は、ホフマンモジュレーションシステム、位相差顕微鏡、および微分干渉顕微鏡のいずれか1つを備える、ことを特徴とする請求項1記載の電気生理特性測定装置。

【請求項5】 前記光照射部は波長可変レーザを備える、ことを特徴とする請求項1記載の電気生理特性測定装置。

【請求項6】 前記光照射部は、

白色光源と、
前記白色光源から出力された白色光を分光出力する分光器と、
前記分光器から出力された光の全波長成分の中から特定の波長の光を選択して出力する光選択器と、
を備えることを特徴とする請求項1記載の電気生理特性測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞などの電気生理学的な測定や記録と近接場顕微観察とを同時に行う電気生理特性測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生細胞の特性の観察にあたって、従来からの光学顕微鏡による形態観察に加えて、電気生理学的特性の観察が注目されている。

【0003】こうしたパッチクランプ法に代表される電気生理特性測定記録法と光学的顕微観察法を融合した複合顕微観察用の装置として、微分干渉顕微鏡の映像をビデオとそれに付随する画像強調装置を用いて観察記録するビデオ強化型微分干渉顕微鏡にレーザピンセットおよびパッチクランプ電流測定装置を組込んだマルチ計測顕微鏡が提案されている（辰巳他、近接場光学研究グループ第二回研究討論会予稿集 pp75-80、1994年11月）。

【0004】このマルチ計測顕微鏡装置では、落射照明光を集光して試料に照射する第1の対物レンズとして水浸式で開口数の大きな対物レンズを用いることにより側方からのパッチ電極の進入を可能とするとともに、Ar-Krレーザ光源から出力された波長=643nmの光を落射蛍光の光路に導入して、第1の対物レンズに試料を挟んで対向して設置された開口数の大きな第2の対物レンズで集光して試料に照射してレーザピンセット機能を実行させる。

【0005】この装置では、通常のレンズ光学系を用いた光学顕微鏡下で、パッチ電極を試料の近くまで接近させた後、電極から与えるパルス電気信号に応じて発生する電気信号を電極で検出し、検出された電気信号の振幅を指標にして、パッチ電極を試料表面に接触させる。この後、パッチ電極内を陰圧にして、試料の膜を電極内に引き込み、ギガオーム（GΩ）シールを形成させる。

【0006】こうして、この装置では、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡で細胞膜の光学的な映像を捉えるとともに、レーザピンセット機能のオン／オフ時における生体膜電流の変化を観察する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】パッチクランプ法に代表される電気生理特性測定と光学的顕微観察とを融合した複合観察では、精度良く限定された微小な領域からの

電気生理特性の情報を選択性を高くして取得することが条件となる。

【0008】この条件に対して、従来のパッチクランプ装置では、(i) 検出される電気信号の振幅および光学顕微鏡像を指標にして、パッチ電極をマイクロコンピュータを操作して試料の膜に接近させるので、接触後には電気信号の振幅が変化しなくなり、また光学顕微鏡観察からも電極先端の精密な視認が困難であることから、電極の位置を進めすぎて試料を傷つけてしまう場合が多い。

【0009】また、光学プローブとしてレーザーピンセットを用いる従来の装置では、(ii) 落射蛍光の光路にレーザー光を導入し、開口数の大きな対物レンズで集光し、試料に照射するレーザーピンセットなので、光の作用の及ぶ領域が照射光の光軸方向に限定できないという問題点があった。

【0010】本発明は、上記を鑑みてなされたものであり、簡便かつ確実にGΩシールの形成が可能であり、高い位置分解能で顕微鏡観察や電気生理学特性測定が可能な電気生理特性測定装置を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】請求項1の電気生理特性測定装置は、(a) 試料の広域像を観察する光学顕微鏡部と、(b) 先端に微小開口を有し、外周部に光反射膜および絶縁膜が形成されるとともに、内部空間に電極液を収納し、後端の開口から前記微小開口の径より長い波長の光が導入されると、前記微小開口からエバネッセント光を出力するガラスマイクロピペット電極と、(c) 照射光を発生する光照射部を備え、ガラスマイクロピペット電極を移動しながら、ガラスマイクロピペット電極を介してエバネッセント光を試料に照射し、試料の局所像を観察する走査型近接場光学顕微鏡部と、(d) ガラスマイクロピペット電極と試料との間の距離を200nm以下に近接させる電極高さ設定手段と、(e) ガラスマイクロピペット電極を通して電圧を印加して、その結果生じた電流を検出するとともに、試料中の単一の生細胞あるいは生体膜の微小な領域から生体膜を横切る電流を電極液を介して導出して記録するパッチクランプ測定部と、(f) 走査型近接場光学顕微鏡部から得られた試料の局所像と、走査型近接場光学顕微鏡部の光の照射位置ごとにパッチクランプ測定部から得られた電気生理学的情報とを収集し、記録し、解析するとともに、装置全体を制御する解析制御部とを備えることを特徴とする。

【0012】ここで、パッチクランプ測定部は、(i) ガラスマイクロピペット電極で検出された生体電気信号である生体膜を横切る電流信号を入力し、電圧信号に変換し、増幅して出力する前置増幅器と、(ii) 解析制御部からの指示により、シール抵抗の測定、膜電位固定、または膜電流固定に関する指令信号を出力する電気信号発生装置と、(iii) 前置増幅器から出力された電圧信

号を入力し、増幅し、処理して解析制御部へ向けて出力するとともに、電気信号発生装置から出力された指令信号を入力し、演算処理して前置増幅器へ向けて出力する主増幅器とを備えることを特徴としてもよい。

【0013】また、電極高さ設定手段には、シヤフォースノンコンタクト原子間力顕微鏡で採用されている共振位相検知法を好適に採用できる。

【0014】また、光学顕微鏡部では、コントラスト増強が可能な、ホフマンモジュレーションシステム、位相差顕微鏡、または微分干渉顕微鏡を好適に使用できる。

【0015】また、光照射部は、波長可変レーザを備えることとしてもよいし、また、(i) 白色光源と、(ii) 白色光源から出力された白色光を分光出力する分光器と、(iii) 分光器から出力された光の全波長成分の中から特定の波長の光を選択して出力する光選択器とを備えることとしてもよい。

【0016】請求項1の電気生理特性測定装置では、まず、光学顕微鏡部で試料の広域像を得る。こうして得られる試料の広域像に基づいて、ガラスマイクロピペット電極を形態観察の対象である細胞などの生体試料上の位置に移動する。引き続き、ガラスマイクロピペット電極の先端を試料表面の近接場領域である初期位置まで接近させる。ガラスマイクロピペット電極の近接場領域への移動にあたっては、ノンコンタクト走査型顕微鏡モードまたはシヤフォースノンコンタクト走査型顕微鏡モードなどの方式を好適に使用できる。

【0017】こうして、試料の近接場顕微鏡観察による形態観察にあたっての幾何学的準備が完了し、形態観察を開始する。

【0018】まず、光照射部が発生した照射光を初期位置に設定されたガラスマイクロピペット電極を介して照射する。ここで、ガラスマイクロピペット電極を介して試料に照射される照射光は非放射光であるエバネッセント光であり、結像のためのレンズなどを用いないので、レンズの開口による回折の制限を受けず、位置分解能がガラスマイクロピペット電極の先端の開口径のみで決定される。この結果、ガラスマイクロピペット電極の先端の径を数100nmにし、ガラスマイクロピペット電極と試料との間を近接場領域となる数100nm以下とすれば、照射光の波長の数分の1～数10分の1の分解能で、試料の微細な形状や構造、あるいは微小領域における光学的な特性が観察できる。こうして観察される試料の局所像は解析制御部に通知される。

【0019】解析制御部は、走査型近接場光学顕微鏡部から通知された試料の局所像情報と、パッチクランプ測定部から通知された電気生理学的特性情報を収集し、初期位置情報とともに格納する。

【0020】次に、解析制御部は、走査型近接場光学顕微鏡部に走査を指示する。そして、走査位置ごとに、上記と同様にして、試料の局所像情報を収集し、走査位置

情報とともに格納する。

【0021】走査にあたって、近接場領域内での走査を確保するためには、コンスタントハイトモード制御、ノンコンタクト走査型顕微鏡モード制御、またはシアフォースノンコンタクト走査型顕微鏡モード制御などの方式を好適に使用できる。

【0022】走査、情報収集、および情報格納の完了後、解析制御部は格納情報に基づいて、解析制御部は、試料の走査領域全体の光学像情報を解析し、顕微観察像を再構成して表示や記録などを行う。この結果、通常の光学顕微鏡による形態観察に比べて、より高い空間分解能で試料の形態の観察ができる。

【0023】また、照射光の波長を変化させて各波長ごとに、上記と同様に、走査、情報収集、および情報格納を行い、試料の走査領域全体の光学像情報を解析し、顕微観察像を再構成して表示や記録などを行う。この結果、照射光の波長に応じた多角的な試料の観察ができる。

【0024】次に、上記の顕微観察像に基づいて、ガラスマイクロピペット電極を近接場顕微鏡部の走査手段を用いて電気生理測定点の上方に移動する。

【0025】次いで、電極高さ設定手段を用いて、ガラスマイクロピペット電極を試料表面に接近させる。また、これと同時に、ガラスマイクロピペット電極を通して電圧を印加し、生じる電流をモニタする。

【0026】そして、電極高さ設定手段で200nm以内に接近したと判断されたこと、および、モニタ電流が充分小さくなったと判断されたことを条件として、接近操作を止める。

【0027】この結果、試料の表面からの距離が200nm以下であり、かつ、試料を傷つけない高さにガラスマイクロピペット電極の先端が確実に設定される。

【0028】次に、電極内を陰圧にして、試料の膜を電極内に引き込み、GΩシールを形成し、電極内部に電解液を導入する。なお、ガラスマイクロピペット電極の外周には絶縁膜が形成されているので、ギガオーム(GΩ)シールが確実に形成される。

【0029】こうして、試料の電気生理学的観察にあたっての幾何学的準備が完了する。そして、試料中の単一の生細胞あるいは生体膜の微小な領域から生体膜を横切る電流を電極液を介してパッチクランプ測定部で導出し、電圧信号への変換や増幅などを施して解析制御部へ通知する。解析制御部では、パッチクランプ測定部から通知された電気生理学的情報を収集し、記録し、解析する。

【0030】また、光照射部が発生した照射光をガラスマイクロピペット電極を介して照射すると、光の照射によって発生した試料内の電気生理学的変化に伴う生体膜を横切る電流は、ガラスマイクロピペット電極から導出されてパッチクランプ測定部で測定され、測定結果が解

析制御部に通知される。

【0031】解析制御部は、走査型近接場光学顕微鏡部から通知された試料の局所像情報に加えて、パッチクランプ測定部から通知された電気生理学的特性情報を収集し、電気生理測定点情報とともに格納する。

【0032】また、照射光の波長を変化させて各波長ごとに、情報収集、および情報格納を行い、試料の光照射位置に応じた電気生理学的特性情報を解析し、顕微観察像と生体電気反応とを対応させて再構成して表示や記録などを行う。この結果、照射光の波長に応じた多角的な試料の観察ができる。

【0033】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照して本発明の光学プローブ顕微鏡装置の実施の形態を説明する。なお、図面の説明にあたって同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

【0034】図1は、本発明の電気生理特性測定装置の全体構成図である。この装置は、近接場顕微鏡機能により高い位置分解能で試料の光学像を得るとともに、パッチクランプ測定機能により光刺激による電気生理学的特性の変化を測定する装置である。

【0035】図1に示すように、この装置は、(a)試料900の広域像を観察する光学顕微鏡部100と、

(b)先端に微小開口を有し、外周部に光反射膜および絶縁膜が形成されるとともに、内部空間に電極液を収納し、後端の開口から微小開口の径より長い波長の光が導入されると、微小開口からエバネッセント光を出力するガラスマイクロピペット電極200と、(c)照射光を発生する波長可変光照射部310を備え、ガラスマイクロピペット電極200を移動しながら、ガラスマイクロピペット電極200を介してエバネッセント光を試料900に照射し、試料900の局所像を観察する走査型近接場光学顕微鏡部300と、(d)ガラスマイクロピペット電極200と試料900との間の距離を200nm以下に近接させる電極高さ設定部400と、(e)ガラスマイクロピペット電極200を通して電圧を印加し、その結果生じた電流を検出するとともに、試料中の単一の生細胞あるいは生体膜の微小な領域から生体膜を横切る電流を電極液を介して導出して記録するパッチクランプ測定部500と、(f)走査型近接場光学顕微鏡部200から得られた試料900の局所像と、走査型近接場光学顕微鏡部300の光の照射ごとにパッチクランプ測定部500から得られた電気生理学的情報とを収集し、記録し、解析するとともに、装置全体を制御する解析制御部600とを備える。そして、収納器700に収納された水浸状態の試料900を観察する。

【0036】光学顕微鏡部100では、ホフマンコンデンサ、位相差顕微鏡、または微分干渉顕微鏡を好適に使用できる。

【0037】ガラスマイクロピペット電極200は、先

端部に数100nm程度の径の開口を有する。

【0038】走査型近接場光学顕微鏡部300は、

(i) 波長可変光照射部310と、(ii) 波長可変光照射部310から出力された照射光がガラスマイクロピペット電極200を介して試料900に照射されて発生する光学像を撮像する撮像部320と、(iii) ガラスマイクロピペット電極200位置を移動させる走査部330とを備える。

【0039】図2は、波長可変光照射部310の構成図である。図2(a)は、波長可変光源を、解析制御部600から指示された波長の光を出力する波長可変レーザ312で構成した場合を示し、また、図3(b)は、波長可変光源を、(i) 白色光源313と、(ii) 白色光源313から出力された白色光を分光出力する分光器314と、(iii) 分光器314から出力された光の内から解析制御部から指示された波長の光を選択して出力する可動スリット315とで構成した場合を示す。

【0040】撮像部320は、(i) 試料からの光を集める対物レンズ321と、(ii) 対物レンズ321を介した光を結像させる結像光学系322と、(iii) 結像面に受光面が設置された撮像器323とを備える。

【0041】電極高さ設定部400では、シヤフォースノンコンタクト原子間力顕微鏡で採用されている共振位相検知法が採用されている。

【0042】パッチクランプ測定部500は、(i) ガラスマイクロピペット電極で検出された生体電気信号である生体膜を横切る電流信号を入力し、電圧信号に変換し、増幅して出力する前置増幅器520と、(ii) 解析制御部600からの指示により、シール抵抗の測定、膜電位固定、または膜電流固定に関する指令信号を出力する電気信号発生装置530と、(iii) 前置増幅器520から出力された電圧信号を入力し、増幅し、処理して解析制御部へ向けて出力するとともに、電気信号発生装置から出力された指令信号を入力し、演算処理して前置増幅器520へ向けて出力する主増幅器540とを備える。

【0043】本実施形態の電気生理特性測定装置では、まず、光学顕微鏡部100で試料900の広域像を得る。こうして得られる試料900の広域像に基づいて、ガラスマイクロピペット電極200を形態観察の対象である細胞などの生体試料900上の位置に移動する。引き続き、ガラスマイクロピペット電極200の先端を試料表面の近接場領域である初期位置まで接近させる。ガラスマイクロピペット電極200の近接場領域への移動にあたっては、ノンコンタクト走査型顕微鏡モードまたはシヤフォースノンコンタクト走査型顕微鏡モードなどの方式を好適に使用できる。

【0044】こうして、試料の近接場顕微観察による形態観察にあたっての幾何学的準備が完了し、形態観察を開始する(図3参照)。

【0045】まず、光照射部310が発生した照射光を初期位置に設定されたガラスマイクロピペット電極200を介して照射する。ここで、ガラスマイクロピペット電極200を介して試料に照射される照射光は非放射光であるエバネセント光であり、結像のためのレンズなどを用いないので、レンズの開口による回折の制限を受けず、位置分解能がガラスマイクロピペット電極200の先端の開口径のみで決定される。この結果、ガラスマイクロピペット電極の先端の径を数100nm程度とし、ガラスマイクロピペット電極と試料との間を近接場領域となる数100nm以下とすれば、照射光の波長の数分の1～数10分の1の分解能で、試料900の微細な形状や構造、あるいは微小領域における光学的な特性が撮像部320で撮像され、観察できる。こうして観察される試料の局所像は解析制御部600に通知される。

【0046】解析制御部600は、走査型近接場光学顕微鏡部200から通知された試料900の局所像情報を収集し、初期位置情報とともに格納する。

【0047】次に、解析制御部600は、走査型近接場光学顕微鏡部300に走査を指示する。そして、走査位置ごとに、上記と同様に、試料900の局所像情報を収集し、走査位置情報とともに格納する。

【0048】走査にあたって、近接場領域内での走査を確保するためには、コンスタントハイトモード制御、ノンコンタクト走査型顕微鏡モード制御、またはシヤフォースノンコンタクト走査型顕微鏡モード制御などの方式を好適に使用できる。

【0049】走査、情報収集、および情報格納の完了後、解析制御部600は格納情報に基づいて、解析制御部600は、試料の走査領域全体の光学像情報を解析し、顕微観察像を再構成して表示や記録などを行う。この結果、通常の光学顕微鏡による形態観察に比べて、より高い空間分解能で試料900の形態の観察ができる。

【0050】また、照射光の波長を変化させて各波長ごとに、上記と同様に、走査、情報収集、および情報格納を行い、試料900の走査領域全体の光学像情報を解析し、顕微観察像を再構成して表示や記録などを行う。この結果、照射光の波長に応じた多元的な試料の観察ができる。

【0051】次に、上記の顕微観察像に基づいて、ガラスマイクロピペット電極200を近接場顕微鏡部200の走査手段を用いて電気生理測定点の上方に移動する。

【0052】次いで、電極高さ設定部400を用いて、ガラスマイクロピペット電極200を試料表面に接近させる。また、これと同時に、ガラスマイクロピペット電極200を通して電圧を印加し、生じる電流をモニタする。

【0053】そして、電極高さ設定部で200nm以内に接近したと判断されたこと、および、モニタ電流が充分小さくなったと判断されたことを条件として、接近操

作を止める。

【0054】この結果、試料900の表面からの距離が200nm以下であり、かつ、試料を傷つけない高さにガラスマイクロピペット電極200の先端が確実に設定される(図4参照)。

【0055】次に、電極200内を陰圧にして、試料900の膜を電極内に引き込み、GΩシールを形成させる(図5参照)。このとき、GΩシールの形成までの過程を電氣的にモニタするため、シール抵抗値の測定、膜電位固定および膜電流固定するための指令パルスを主増幅器540を介して前置増幅器520に出力するために、解析制御部600の制御を受けたパルスジェネレータ530を用いる。なお、ガラスマイクロピペット電極200の外周には絶縁膜が形成されているので、ギガオーム(GΩ)シールが確実に形成される。

【0056】こうして、試料900の電気生理学的観察にあたっての幾何学的準備が完了する。そして、試料900中の単一の生細胞あるいは生体膜の微小な領域から生体膜を横切る電流をマイクロピペット電極200から導出してパッチクランプ測定部で測定し、測定結果が解析制御部600へ通知される。なお、パッチ電極310で導出された電流・電位は、前置増幅器520内の電流電圧変換器により電圧信号に変換されるが、微小信号なので増幅、演算、電流雑音の低減などの処理を行う主増幅器540を介して解析制御部600に通知される。

【0057】解析制御部600では、パッチクランプ測定部500から通知された電気生理学的情報を収集し、記録し、解析する。

【0058】また、光照射部310が発生した照射光をガラスマイクロピペット電極200を介して照射すると、光の照射によって発生した試料内の電気生理学的変化に伴う生体膜を横切る電流は、ガラスマイクロピペット電極200から導出されてパッチクランプ測定部で測定され、測定結果が解析制御部600に通知される(図6参照)。

【0059】解析制御部600は、走査型近接場光学顕微鏡部200から通知された試料900の局所像情報に加えて、パッチクランプ測定部500から通知された電気生理学的特性情報を収集し、電気生理測定点情報、照射光情報(照射光強度)とともに格納する。

【0060】また、照射光の波長を変化させて各波長ご

とに、情報収集、および情報格納を行い、試料900の光照射位置に応じた電気生理学的特性情報を解析し、顕微観察像と生体電気反応とを対応させて再構成して表示や記録などを行う。この結果、照射光の波長に応じた多元的な試料の観察ができる。

【0061】なお、本実施形態の装置を用いて、経時的に情報収集することにより、照射光に対応して生じる試料900の電気生理学的特性の変化を経時的に観察することもできる。

【0062】

【発明の効果】以上、詳細に説明した通り、本発明の電気生理特性測定装置によれば、走査型近接場光学顕微鏡部によって光学的顕微鏡観察をし、走査型近接場光学顕微鏡機能に必須の微小開口のガラスマイクロピペット電極による微小領域への光照射によって生じる電気生理学的変化をこのガラスマイクロピペット電極を介してパッチクランプ測定部で測定し、双方の情報を解析制御部で統合するので、簡易な構成で、高い位置分解能で試料の光学的態様と、光刺激位置による電気生理学的態様の变化を観察することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1実施形態の電気生理特性測定装置の構成図である。

【図2】波長可変光照射部の構成図である。

【図3】近接場顕微鏡観察時の試料付近の幾何学的配置の説明図である。

【図4】GΩシール形成直前の試料付近の幾何学的配置の説明図である。

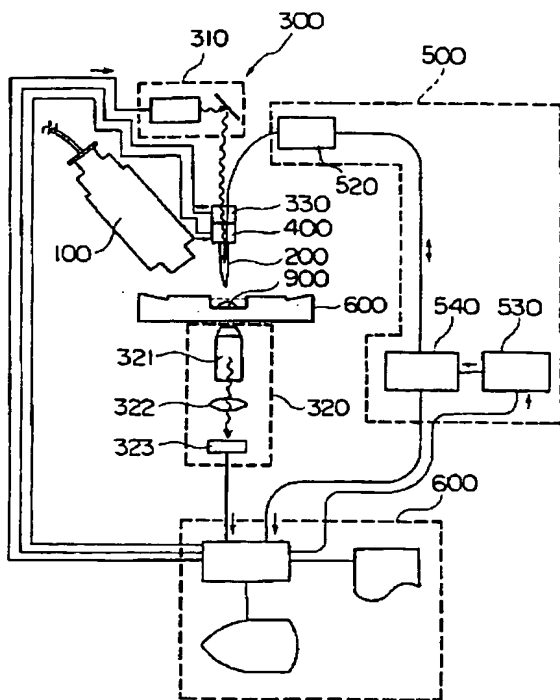
【図5】GΩシール形成後の試料付近の幾何学的配置の説明図である。

【図6】電気生理特性測定時の試料付近の説明図である。

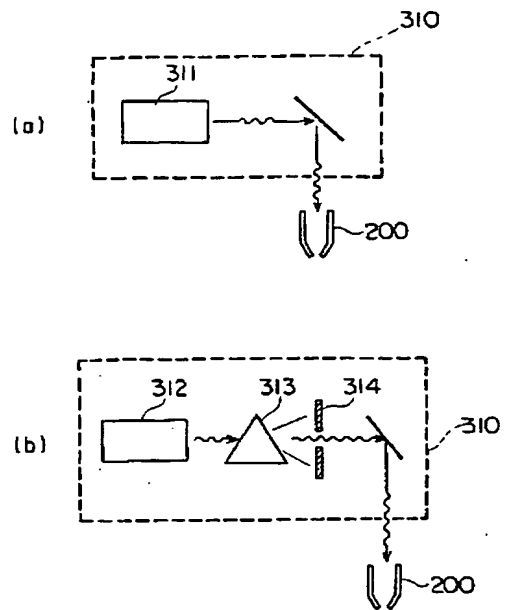
【符号の説明】

100…光学顕微鏡部、200…ガラスマイクロピペット電極、300…走査型近接場光学顕微鏡部、310…波長可変光照射部、311…波長可変レーザ、312…白色光源、313…分光器、314…スリット、400…電極高さ設定部、500…パッチクランプ測定部、510…マイクロマニピュレータ、520…前置増幅器、530…パルスジェネレータ、540…主増幅器、600…解析制御部。

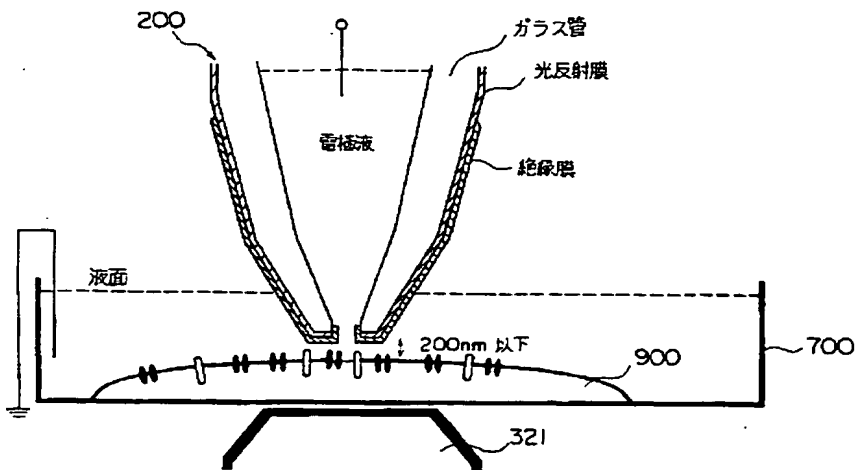
【図1】



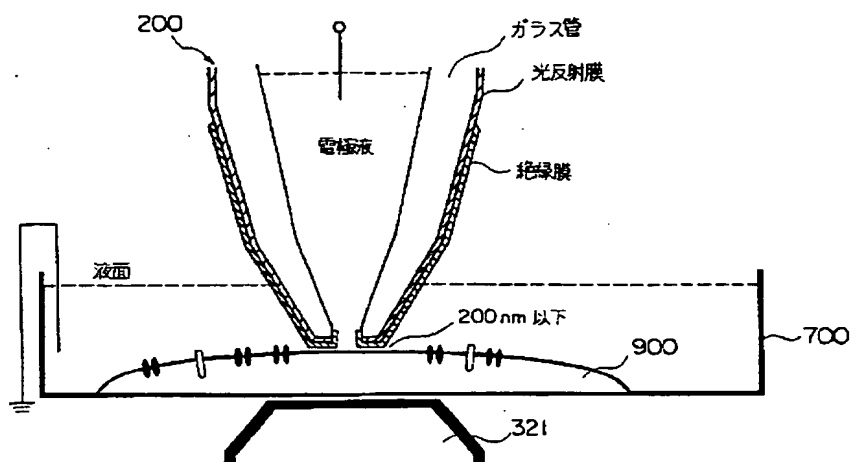
【図2】



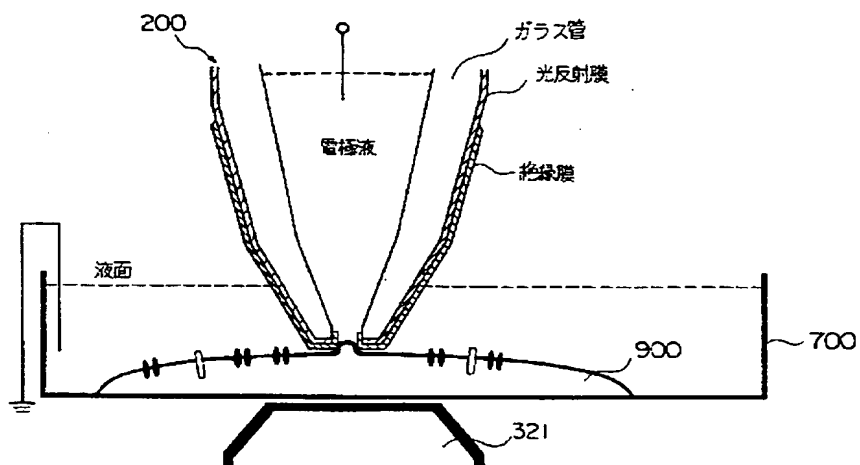
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

